

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
14. Juli 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/064012 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014414

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. Dezember 2004 (17.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 61 137.1 23. Dezember 2003 (23.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ALOPEX GMBH** [DE/DE]; Fritz Hornschuch Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MANN, Wolfgang** [DE/DE]; Hornungsreuth 22A, 95512 Neudrossenfeld (DE). **KRISPIN, Oliver** [DE/DE]; Haydnstrasse 19, 95548 Bayreuth (DE). **HOFFMÜLLER, Petra** [DE/DE]; Romanstrasse 10B, 95444 Bayreuth (DE).

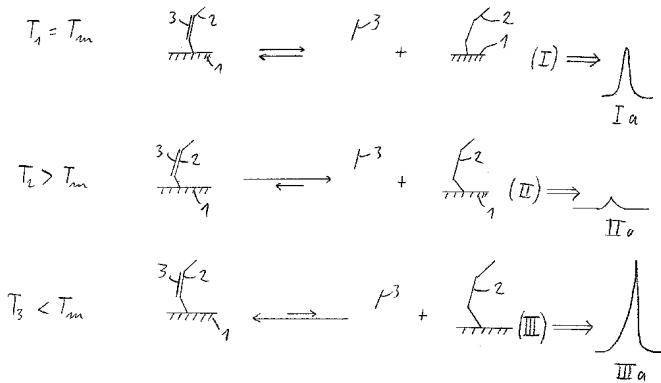
(74) Anwalt: **GANAHL ET AL., Bernhard**; HUBER & SCHÜSSLER, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR VALIDATING AND/OR CALIBRATING A SYSTEM FOR PERFORMING HYBRIDISATION EXPERIMENTS, MICROARRAY, AND KIT THEREFOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM VALIDIEREN UND/ODER KALIBRIEREN EINES SYSTEMS ZUR DURCHFÜHRUNG VON HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTEN, MIKROARRAY UND KIT HIERFÜR



**(57) Abstract:** The invention relates to a method for calibrating and/or validating a system for performing a microarray experiment, in addition to a microarray, and a kit therefor. The inventive method comprises the following steps: a) a microarray is prepared, said microarray comprising at least one first measuring point containing probe molecules (PM) that are complementary to the target molecules and can form, with the target molecules, hybrids that have a melting temperature  $T_m(PM)$ , and at least one second measuring point containing probe molecules (MM1) that are partially complementary to the target molecules and can form, with the target molecules, partial hybrids that have a melting temperature  $T_m(MM1)$ ; b) target molecules are provided, that are complementary to probe molecules (PM) in at least one first measuring point of the microarray; c) a hybridisation experiment is performed with the microarray and the target molecules, with variation of a defined parameter; and d) the signal intensities are determined according to the variation of the parameter. The parameter value at the maximum difference between the signal intensities of the first and second measuring points is the parameter value for which the system is approximately in equilibrium in relation to the hybrids in the first measuring point, and according to which the system is calibrated.

**(57) Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Kalibrieren und/oder Validieren eines Systems zum Durchführen eines Mikroarray-Experiments und ein Mikroarray und ein Kit hierfür. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst folgende Schritte: a) Bereitstellen eines

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

**WO 2005/064012 A2**



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

Mikroarrays mit - zumindest einem ersten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur Tm(PM) aufweisen. - zumindest einem zweiten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur Tm(MM1) aufweisen, b) Bereitstellen von Zielmolekülen die zu Sondenmolekülen (PM) in einem oder mehreren ersten Messpunkten des Mikroarrays komplementär sind, und c) Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Ziel-molekülen bei Variierung eines bestimmten Parameters, d) Feststellen der Signalintensitäten in Abhängigkeit der Veränderung des Parameters, wobei der Parameterwert bei dem maximalen Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte der Parameterwert ist, bei dem das System bezüglich der Hybride in dem ersten Messpunkt annähernd im Gleichgewicht ist, und auf den das System kalibriert wird.

**Verfahren zum Validieren und/oder Kalibrieren eines Systems zur Durchführung von Hybridisierungsexperimenten, Mikroarray und Kit hierfür**

10

Die Erfindung betrifft ein Mikroarray, ein Kit und ein Verfahren zum Validieren  
15 und/oder Kalibrieren eines Systems zur Durchführung von Hybridisierungsexperi-  
menten. Insbesondere betrifft die Erfindung ein DNA-Mikroarray, ein entsprechendes  
Kit und ein entsprechendes Verfahren.

20 Der grundsätzliche Aufbau von DNA-Mikroarrays geht zum Beispiel aus der EP 476  
014 B1, EP 619 321 B1, EP 386 229 B1 und EP 373 203 B1 hervor.

Hierbei sind Fängersonden an einem Substrat fixiert. Jede Fängersonde weist eine  
bestimmte Sequenz auf. Aus einem Probengemisch, in dem sich komplementäre  
Stränge von Nukleinsäuren befinden, werden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip  
25 einzelne Stränge von Nukleinsäuren herausgefangen, in dem sie mit den komple-  
mentären Fängersonden hybridisieren.

Ein System zur Durchführung von Hybridisierungsexperimenten umfasst eine Vor-  
richtung, Reagenzien (Puffer, Waschlösung) und bestimmte Verfahrensschritte (Ap-  
30 plizieren der Probe, Hybridisieren, Waschen).

Zur Durchführung von Hybridisierungsexperimenten gibt es eine Vielzahl unter-  
schiedlicher Vorrichtungen, die in der Regel eine temperierbare Hybridisierungskam-

mer aufweisen, in der das Mikroarray angeordnet wird und mit der Probe und weiteren Reagenzien benetzt wird.

So geht aus der DE 100 50 943 A1 eine entsprechende Hybridisierungskammer her-  
5 vor, in welcher mittels zweier benachbart angeordneter Gefäße, die mit der Hybridisierungskammer kommunizieren, eine zyklische Bewegung des Probenmaterials auf dem Array ausgeführt werden kann.

Die EP 1 132 485 A2 beschreibt eine weitere Hybridisierungsvorrichtung mit einer  
10 Hybridisierungskammer. Diese Hybridisierungskammer besitzt eine transparente Abdeckung. Es ist eine Vorrichtung vorgesehen, mit der während des Hybridisierungsvorganges durch die transparente Abdeckung hindurch die einzelnen Spots auf dem Array abgetastet werden. Es ist eine Temperiereinrichtung vorgesehen, die derart ausgebildet ist, dass das Array auf unterschiedliche Temperaturen temperierbar ist.  
15 Während eines Messlaufes wird die Temperatur variiert und das Array bei unterschiedlichen Temperaturwerten abgetastet. Hierdurch sollen alle Spots zu idealen Bedingungen erfasst werden.

Aus der EP 1 148 119 A1 geht eine weitere Hybridisierungsvorrichtung hervor, bei  
20 welcher die Hybridisierung mittels eines elektrischen Feldes beeinflusst werden soll.

In der US 2003/0162283 A1 ist eine weitere Vorrichtung zum Hybridisieren beschrieben, bei der eine Hybridisierungskammer vorgesehen ist. Die Hybridisierungskammer ist Bestandteil eines Kreislaufes, in dem eine Pumpe angeordnet ist. In diesem  
25 Kreislauf kann das Probenmaterial kontinuierlich umgewälzt werden, so dass die Hybridisierungsexperimente bei einem stetigen Durchfluss des Probenmaterials entlang der Oberfläche des Arrays ausgeführt werden.

Um qualitativ und quantitativ korrekte Ergebnisse zu erhalten, sollten die Probenstränge exakt komplementär zu den Sonden sein und eine genaue Einstellung der physikalischen Bedingungen (Temperatur, Salz, etc.) aufweisen. Korrekt in diesem Zusammenhang bedeutet, dass möglichst nur exakt komplementäre Stränge gebunden werden und dass sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet. Denn nur dann kann analytisch korrekt quantifiziert werden, weil je Zeiteinheit ebenso viele Reakti-

onspartner assoziieren wie dissoziieren. Hier liegt somit ein dynamisches Gleichgewicht vor. Das heißt, dass die Schmelztemperatur  $T_m$  des jeweiligen Hybrides eingesetzt ist.

5 Bei einem komplexen Mikroarray ist es kaum möglich, jede einzelne Hybridisierungsreaktion (in jedem Messpunkt bzw. Spot) im Gleichgewicht zu messen, da sich die Sequenzen und damit ihre Schmelztemperaturen  $T_m$  stets leicht unterscheiden. Die Vorhersage der Schmelztemperatur ist möglich, wobei die experimentelle Bestimmung durch die Unzulänglichkeit der Vorhersage, Sequenzspezifitäten oder thermo-  
10 dynamische Randbedingungen von der Vorhersage abweicht. Verfügbare Software zur Vorhersage von Schmelztemperaturen von DNA-Sequenzen für Mikroarrays sind z. B. Rouillard, JM. et al. (Nucleic Acids Research 2003, 31: 3057-3062): OligoArray2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach; Nielsen, HB. et al. (Nucleic Acids Research 2003, 31: 3491 -3496); Li, F. &  
15 GD Stormo (Bioinformatics 2001, 17: 1067-1076).

Besonders bei der automatisierten Abarbeitung, die die Probenapplikation, Hybridisierungsschritte und Waschprozeduren umfasst, stellt sich oftmals das Problem, dass Abweichungen im Ergebnis der Signalintensitäten sowohl biologischen Ursprung in der Probe haben können, als auch darauf beruhen können, dass die physikalischen und chemischen Randbedingungen nicht korrekt eingehalten worden sind.  
20 Dies hat zur Folge, dass die Auswertung entsprechender Signale mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet ist. Derartige physikalische und chemische Randbedingungen können zum einen vorrichtungsspezifische Merkmale, wie die Geometrie der Hybridisierungskammer, oder verfahrensspezifische Merkmale sein, wie die Temperaturführung am Array, eventuelles Agitieren des Probenmaterials, wie das Probenmaterial appliziert wird oder wie das Array gespült, gewaschen oder getrocknet wird.  
25 Die Ergebnisse können auch von dem verwendeten Puffer, Salz und der Art und Weise wie das Probenmaterial und sonstige Reagenzien pipettiert worden sind, abhängen. Des weiteren können die Signale in Abhängigkeit von der verwendeten Vorrichtung von weiteren physikalischen Parametern abhängen, z.B. der Durchflussgeschwindigkeit (vgl. US 2003/0162283) oder des angelegten elektrischen Feldes (vgl.  
30 EP 1 148 119 A1).

Es ist somit praktisch nicht möglich, Experimente, die mit unterschiedlichen Vorrichtungen oder mit unterschiedlicher Einstellung der physikalischen und chemischen Parameter ausgeführt worden sind, zu vergleichen, selbst wenn der gleiche Typ von Mikroarray verwendet werden sollte.

5

Es besteht daher ein erheblicher Bedarf, ein entsprechendes System zur Durchführung von Hybridisierungsexperimenten zu validieren bzw. zu kalibrieren, damit die erhaltenen Signale vergleichbar sind und Abweichungen im Ergebnis einen sicheren Rückschluss auf die biologische Probe zulassen.

10

Aus

- SASIK, R. u.a.: Statistical analysis of high-density oligonucleotide arrays: a multiplicative noise model. *Bioinformatics* (2002) 18 (12) 1633-40,
- der WO 00/22173 A1,
- HELD, G.A. u.a.: Modeling of DNA microarray data by using physical properties of hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (24.06.2003) 100 (13) 7575-80, und
- URAKAWA, H. u.a.: Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appln. Environ. Microbiol.* (Mai 2003) 69 (5) 2848-56

gehen Mikroarrays hervor, die Sonden, die mit einem bestimmten Zielmolekül perfekt hybridisieren, und weitere Sonden aufweisen, die mit dem bestimmten Zielmolekül nicht perfekt hybridisieren.

15

20

25

30

Aus der US 6,490,533 B2 geht ein Scanner zum Abtasten von Hybridisierungssignalen hervor, wobei die Signale normalisiert werden. Mit der Normalisierung werden unterschiedliche Amplituden von Anregungssignalen aufgrund unterschiedlicher optischer Eigenschaften der Abtastoptik und der Abtastelektronik bei unterschiedlichen Wellenlängen kompensiert.

Die WO 00/52625 beschreibt eine weitere Normalisierung von Daten mittels Software.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, Mittel zur Verfügung zu stellen, die ein Validieren oder Kalibrieren eines Systems zur Durchführung von mittels Mikroarrays ausgeführten Hybridisierungsexperimenten erlauben.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren mit dem Merkmal des Anspruchs 1 bzw. 2 durch ein Mikroarray mit den Merkmalen des Anspruchs 3 und durch ein Kit mit den Merkmalen des Anspruchs 17 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung 5 sind in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Mikroarray zum Validieren und/oder Kalibrieren eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten verwendet, aufweisend:

10 - zumindest einen ersten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_{m(PM)}$  aufweisen,  
- zumindest einen zweiten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den 15 Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_{m(MM1)}$  aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst ferner die Schritte:

20 - Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Zielmolekülen bei Variierung eines bestimmten Parameters,  
- Feststellen der Signalintensitäten in Abhängigkeit der Veränderung des Parameters, wobei der Parameterwert bei dem maximalen Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte der Parameterwert ist, bei dem das System bezüglich der Hybride in dem ersten Messpunkt annähernd im Gleichgewicht ist,  
25 und auf den das System kalibriert wird.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden somit Hybridisierungsexperimente unter bestimmten Reaktionsbedingungen (verwendete Vorrichtung, verwendetes Hybridisierungsprotokoll, etc.), bei dem Zielmoleküle mit den Sondenmolekülen auf dem 30 Mikroarray in Verbindung gebracht werden, die mit diesen Hybride oder Fehlhybride ausbilden, durchgeführt. Aus der Menge der jeweils gebildeten Hybride und Fehlhybride und deren Verhältnis zueinander lässt sich darauf schließen, ob die Reaktionsbedingungen dazu geeignet sind, die gewünschten Anforderungen an ein Hybridisierungsexperiment zu erfüllen. Wenn das der Fall ist, sind die Reaktionsbedingungen

(oder das System, die Vorrichtung, das Verfahren) validiert. Vergleicht man die Ergebnisse von verschiedenen Hybridisierungsexperimenten, die bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden, untereinander, kann man diejenigen Reaktionsbedingungen auswählen, bei denen die gewünschten Anforderungen am

5 besten erfüllt sind oder zumindest einen Mindeststandard erfüllen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Kalibrierung eines Systems unter realen Versuchsbedingungen.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zum Validieren eines Systems

10 zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten mit folgenden Schritten:

- Bereitstellen des oben genannten Mikroarrays,
- Bereitstellen von Zielmolekülen, die zu den Sondenmolekülen (PM) in einem oder mehreren ersten Messpunkten des Mikroarrays komplementär sind, und
- Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Zielmolekülen bei Standardparametern bei Verwendung des zu validierenden Systems,

15 - Feststellen der Signalintensitäten, wobei die Validierung erfolgreich ist, wenn der Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte einem vorbestimmten Validierungswert entspricht.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Validierung eines Systems unter realen Versuchsbedingungen. Es ermöglicht darüber hinaus auch den Vergleich verschiedener Systeme untereinander.

Das erfindungsgemäße Mikroarray zum Validieren und/oder Kalibrieren eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten, umfasst:

25

- einen PM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  aufweisen.
- einen MM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  aufweisen, wobei

30 das Mikroarray mehrere PM-Messpunkte mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen und dazu korrespondierende MM-Messpunkte aufweist und die unterschiedlichen

Schmelztemperaturen mindestens einen Bereich von 15°C abdecken.

Nach einer vorteilhaften Ausgestaltung weist das erfindungsgemäße Mikroarray außerdem auf:

5 Zumindest einen zweiten einem bestimmten PM-Messpunkt zugeordneten MM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM2), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind, die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die sich von den Sondenmolekülen des anderen zum PM-Messpunkt korrespondierenden MM-Messpunktes unterscheiden und die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM2)$  aufweisen

Weitere vorteilhafte Ausgestaltung eines erfindungsgemäßen Mikroarrays sind dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle ausgebildet sind aus: DNA, RNA, mRNA, cDNA, PNA, tRNA, mRNA, LNA, aRNA, PNA, Proteinen, Antigenen/Antikörper, Peptide, Steroidhormone oder andere biologisch relevante Analyten

- Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung eines erfindungsgemäßen Mikroarrays ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle ausgebildet sind aus ex-situ hergestellten Oligonukleotiden.

20 Solche Sondenmoleküle können gut in Reinform bereitgestellt werden, weshalb die Homogenität von Messpunkten gut gewährleistet werden kann. Ihre Verwendung führt daher auf ökonomische Weise zu qualitativ hochwertigen Mikroarrays.

25 Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen eines erfindungsgemäßen Mikroarrays sind dadurch gekennzeichnet, dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  und/oder  $T_m(MM2)$  von Fehlhybriden zumindest 0,5°C beträgt.

30 Ein solches Mikroarray ermöglicht eine besonders genaue und komfortable Kalibrierung oder Validierung eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen eines erfindungsgemäßen Mikroarrays sind dadurch gekennzeichnet, dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  und/oder  $T_m(MM2)$  von Fehlhybriden zwischen 0,1°C und 5°C beträgt.

5

Eine bevorzugte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Mikroarrays ist dadurch gekennzeichnet, dass jeder Messpunkt auf dem Array mehrfach vorkommt.

Ein solches Mikroarray ermöglicht es, lokal Unterschiede von Hybridisierungsreaktionen 10 in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen bei der Kalibrierung oder Validierung eines Systems zu erkennen.

Vorteilhaft ist ferner eine Ausgestaltung, bei der der PM-Messpunkt in unmittelbarer Nachbarschaft zum MM-Messpunkt (MM1) beziehungsweise zu dem weiteren MM- 15 Messpunkt (MM2) ist.

Durch die unmittelbare Nachbarschaft der Sonden werden unterschiedliche Reaktionsbedingungen, die an unterschiedlichen Stellen eines Arrays gegebenenfalls auftreten können, beispielsweise bedingt durch unterschiedliche Schichtdicken an den 20 verschiedenen Enden des Mikroarrays, oder bedingt durch andere Unwägbarkeiten, auf ein Minimum reduziert.

Ein Mikroarray mehreren PM-Messpunkten, vorzugsweise mehr als 2 oder 3 PM-Messpunkte, ermöglicht die Durchführung von Kalibrierverfahren oder Validierverfahren 25 bei einem vergleichsweise großen Temperaturumfang.

Vorteilhafterweise ist ein solches Mikroarray ferner dadurch gekennzeichnet, dass der Unterschied der Schmelztemperaturen von Hybriden der Zielmoleküle mit dazu komplementären Sondenpunkten unterschiedlicher PM-Messpunkte zumindest 1°C 30 bis 10°C beträgt.

Vorteilhafterweise ist ein solches Mikroarray ferner dadurch gekennzeichnet, dass die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der unterschiedlichen PM-Messpunkte einen

Bereich von mindestens 20°C bis 60°C abdecken.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Kit zum Validieren und/oder Kalibrieren von Systemen zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten, umfassend:

5    - ein erfindungsgemäßes Mikroarray, und  
- zumindest Zielmoleküle, die zu den Sondenmolekülen (PM) auf dem Mikroarray komplementär sind.

10   Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle (PM, MM) und die Zielmoleküle ausgebildet sind aus: DNA, RNA, mRNA, cDNA, PNA, tRNA, mRNA, LNA, aRNA, PNA, Proteinen, Antigenen/Antikörper, Peptide, Steroidhormone oder andere biologisch relevante Analyten

15   Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_{m(PM)}$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_{m(MM)}$  von Fehlhybriden zumindest 0,5 K beträgt.

20   Im folgenden wird die Erfindung beispielhaft anhand der Zeichnungen näher erläutert.

Die Zeichnungen zeigen in

25   Figur 1    jeweils schematisch drei mögliche Zustände eines Hybridisierungsgleichgewichtes zwischen Sondenmolekülen und Zielmolekülen, sowie daraus resultierende Signalintensitäten,

Figur 2A    eine schematische Darstellung des Aufbaus von Sondenmolekülen eines erfindungsgemäßen Mikroarrays,

30   Figur 2B    eine schematische Darstellung des Aufbaus von weiteren Sondenmolekülen eines erfindungsgemäßen Mikroarrays,

-10-

Figur 3 eine Tabelle, die die Sondenmoleküle eines erfindungsgemäßen Mikroarrays auflistet,

5 Figur 4A eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Zielmoleküls nach der vorliegenden Erfindung,

Figur 4B eine schematische Darstellung des Aufbaus weiterer Zielmoleküle nach der Erfindung,

10 Figur 5 eine Tabelle, in der unterschiedliche Zielmoleküle nach der Erfindung aufgelistet sind,

Figur 6 eine schematische Darstellung der Signalintensitäten in den Messpunkten einer Mehrzahl von erfindungsgemäßen Mikroarrays nach Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens,

Figuren 7A bis 7D jeweils Tabellen, die sich auf jeweils auf einen der in der Figur 6 dargestellten Mikroarrays bei unterschiedlichen Temperaturen bezieht,

20 Figur 8 ein Hybridisierungsprotokoll, und

Figur 9 eine Tabelle, die die Sondenmoleküle eines erfindungsgemäßen Mikroarrays und die korrespondierenden unterschiedlichen Zielmoleküle auf-  
listet.

25 Mikroarrays weisen ein Substrat 1 auf, an dem Sondenmoleküle 2 angeordnet sind, die mit Zielmolekülen 3 ein Hybrid bilden können. In der Regel sind die Sondenmoleküle 2 auf dem Substrat 1 in Messpunkten gruppiert, die auch als Spots bezeichnet werden.

30 Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Mikroarray verwendet, das zumindest einen ersten Messpunkt bzw. PM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM; PM = perfect match) auf, die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m$

(PM) aufweisen, und zumindest einen zweiten Messpunkt bzw. MM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1; mm = mismatch), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m$  (MM1) aufweisen.

5

Fehlhybride sind Hybride, die aus einem Sondenmolekül und einem Zielmolekül ausgebildet sind, die nicht exakt komplementär sind. Sind die Sondenmoleküle und die Zielmoleküle aus Oligonucleotiden oder anderen Sequenzen ausgebildet, so weisen die Fehlhybride typischerweise eine oder zwei Fehlstellen auf. Die Zielmoleküle und 10 die Sondenmoleküle müssen jedoch keine Sequenz sein. So können sie zum Beispiel auch aus Antigenen und korrespondierenden Antikörpern ausgebildet sein, die auch nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip ein Hybrid bilden können. Fehlhybride werden in diesem Fall durch Sondenmoleküle ausgebildet, die nicht exakt zu den Zielmolekülen passen, jedoch deren Abweichung so gering ist, dass bei einer Absenkung der Schmelztemperatur  $T_m$  (PM) auch eine Hybridisierung möglich ist. Daher 15 kann ein Fehlhybrid auch über seine Schmelztemperatur  $T_m$  (MM) definiert sein, die mindestens 0,5 °C kleiner als die Schmelztemperatur  $T_m$  (PM) des Hybrides aus komplementären Zielmolekül und Sondenmolekül ist. Vorzugsweise ist die Schmelztemperatur  $T_m$  (MM) kleiner als 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C bzw. 10 °C als die Schmelztemperatur  $T_m$  (PM). 20

Bringt man die Oberfläche eines erfindungsgemäßen Mikroarrays unter typischen Hybridisierungsbedingungen, die dem Fachmann bekannt sind, mit Zielmolekülen in Verbindung und wählt man als Hybridisierungstemperatur die Schmelztemperaturen 25 ( $T_1 = T_m$ ), so stellt sich ein heterogenes Gleichgewicht zwischen den am Substrat 1 angeordneten Sondenmolekülen PM 2 (feste Phase) und den freien Zielmolekülen 3 auf der einen Seite und den sich aus den Sondenmolekülen 2 und den Zielmolekülen 3 bildenden Hybriden 4 mit der Schmelztemperatur  $T_m$  ein (Fig. 1 oben). Bei  $T_m$  entspricht die Menge der Hybride der Menge freier Sondenmoleküle. Dieser Umstand 30 wird durch gleich lange Reaktionspfeile angedeutet. Unterbricht man das Experiment an dieser Stelle, so erhält man in dem Sondenpunkt, in dem sich die Sondenmoleküle 2 befinden, eine Signalintensität Ia.

Führt man dasselbe Experiment bei einer Temperatur  $T_2$  durch, die größer als die Schmelztemperatur ist ( $T_2 > T_m$ ), so ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit kleiner als die Dissoziationsgeschwindigkeit, und es liegen mehr vereinzelte Zielmoleküle 3 und Sondenmoleküle 2 vor als Hybride 4 vor (Figur 1 Mitte, angedeutet durch unterschiedlich lange Reaktionspfeile).

5 Unterbricht man das Experiment an dieser Stelle und wertet man das Mikroarray aus, so detektiert man in einem Messpunkt weniger Hybride und erhält daher eine Signalintensität IIa, die kleiner ist als die im ersten Experiment gemessene Signalintensität Ia.

10 Führt man das Experiment bei einer Temperatur  $T_3$  durch, die kleiner als die Schmelztemperatur ist, ( $T_3 < T_m$ ), so verläuft die Hybridisierungsreaktion schneller als die Dissoziationsreaktion, und zumindest theoretisch müsste daraus resultieren, dass mehr Hybride vorliegen, als Einzmoleküle, was zu einer höheren Signalintensität IIIa in dem entsprechenden Messpunkt führen sollte. Dies muss nicht immer der Fall sein, da Zielmoleküle durch Fehlhybridisierungen mit anderen Sonden dem Reaktionsgemisch entzogen sein können.

Die Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  von Hybriden zwischen einem Zielmolekül und einem Sondenmolekül, das komplementär zu dem Zielmolekül ist, ist grundsätzlich höher

20 als die Schmelztemperatur  $T_m(MM)$  eines Fehlhybrides zwischen einem Zielmolekül und einem unvollständig komplementären Sondenmolekül. Wenn  $T_1 = T_m(PM)$  ist, gilt darum zugleich  $T_1 > T_m(MM)$ , woraus für Hybride eine normale Signalintensität Ia resultiert und für Fehlhybride eine geringe Intensität IIa, wie in Figur 1 schematisch dargestellt.

25 Führt man das Experiment bei einer Temperatur  $T_2 > T_m(PM)$  durch, so folgt daraus, dass man sowohl für die Hybride als auch für die Fehlhybride jeweils schwache Signalintensitäten erhält, woraus wiederum folgt, dass sie sich weniger stark voneinander unterscheiden als die Signalintensitäten bei  $T_m(PM)$ .

30 Führt man das Experiment bei einer Temperatur  $T_3 < T_m(PM)$  durch, so liegt diese Temperatur  $T_3$  näher an der Schmelztemperatur  $T_m(MM)$  der Fehlhybride als  $T_2$  oder  $T_1$ , und man erhält dann für die Fehlhybride höhere Signalintensitäten als bei den anderen beiden Experimenten. Gegenüber einem Experiment mit der Temperatur  $T_1$

nimmt die Signalintensität des Signals der Hybride aber nicht in dem Maße zu, wie die Signalintensität des Signals der Fehlhybride, zumal die Bildung von Fehlhybriden Zielmoleküle aus dem Reaktionsgemisch entfernt, die dann für eine Hybridbildung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dadurch nimmt der Abstand zwischen diesen bei-

5 den Signalintensitäten ab.

Der Unterschied zwischen den Signalintensitäten von Messpunkten, die Hybride aufweisen, und von Messpunkten, die Fehlhybride aufweisen, ist darum bei einer Temperatur  $T_1$ , die der Schmelztemperatur  $T_m$  der Hybride entspricht, am größten.

10

Aus den oben in der Beschreibungseinleitung genannten Gründen ist es für die Reproduzierbarkeit und die Aussagekraft von Mikroarray-Hybridisierungsexperimenten wünschenswert, dass das jeweilige Hybridisierungsexperiment bei einer Temperatur durchgeführt wird, die annähernd der Schmelztemperatur  $T_m$  der denkbaren Hybride 15 zwischen den auf den Mikroarray vorhandenen Sondenmolekülen und den dazu passenden Zielmolekülen entspricht. Nur dann, wenn physikalische und chemische Parameter eingehalten werden, die die Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes ermöglicht, bei dem die Dissoziationsgeschwindigkeit zumindest annähernd der Assoziationsgeschwindigkeit entspricht, ist die Menge detektierbarer Fehlhybridisierungen gering im Vergleich zu der Menge detektierbarer Hybridisierungen, und nur dann 20 lassen sich zuverlässige qualitative und gegebenenfalls quantitative Aussagen oder solche über die Mengenverhältnisse von Zielmolekülen in einer biologischen Probe machen.

25

Die berechneten Schmelztemperaturen von unterschiedlichen Sondenmolekülen (bzw. deren Hybriden mit Zielmolekülen) auf einem Mikroarray sind aus diesem Grund im allgemeinen möglichst identisch oder liegen zumindest in einem sehr engen Temperaturbereich. Diese Temperatur wird im allgemeinen mit Verfahren nach dem Stand der Technik berechnet, wie es oben ausgeführt wurde. Diese Berechnungen gehen von idealisierten Bedingungen aus und es ist nicht möglich, diese Berechnungen so genau durchzuführen, dass alle Einflüsse, die auf das jeweilige Hybridisierungsexperiment wirken können, in die Berechnung mit einfließen. Dazu gehören eine Vielzahl von Parametern, beispielsweise der in einer Hybridisierungskammer vorherrschende Druck, die Geometrie der verwendeten Hybridisie-

30

rungskammer, die Art und Weise der Auftragung eines Reaktionsgemisches, die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches (Konzentration an Zielmolekülen, darin enthaltene Puffer, ph-Wert, etc.), die Reaktionsdauer, usw.

- 5 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Mikroarrays lässt sich nun genau ermitteln, bei welchen physikalischen und/oder chemischen Parametern das Gleichgewicht am ehesten dem gewünschten Gleichgewicht entspricht, also demjenigen, bei dem Assoziation und Dissoziation mit gleicher Geschwindigkeit vonstatten gehen.
- 10 Selbst wenn man immer dasselbe Gerät verwendet, können sich auf Grund der Abnutzung desselben von Experiment zu Experiment erhebliche Unterschiede ergeben, beispielsweise auf Grund von Abnutzungserscheinungen, beispielsweise bei einem Peltierelement, das nach einer gewissen Betriebsdauer an Leistung verliert, und darum nach dieser Betriebsdauer ein anderes Temperaturintervall bereitstellt, als zu Beginn seiner Lebensdauer. Aus diesem Grund ist es erforderlich, Systeme zum Hybridisieren entsprechend zu kalibrieren.
- 15

Das erfindungsgemäße Mikroarray ermöglicht es, ein Verfahren zum Kalibrieren durchzuführen, bei dem das Mikroarray mit Zielmolekülen, die zu den Sondenmolekülen im ersten Messpunkt des Mikroarrays komplementär sind, in Verbindung gebracht werden und ein bestimmter Parameter, der kalibriert werden soll, bei den Hybridisierungsexperimenten kalibriert wird.

- 20 Anschließend stellt man die jeweiligen Signalintensitäten in den Messpunkten mit Hybriden (erste Messpunkte) und in den Messpunkten mit Fehlhybriden (zweite Messpunkte) in Abhängigkeit der Veränderung des Parameters fest. Der Parameterwert bei dem maximalen Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte ist aus den oben genannten Gründen der Parameterwert, bei dem das System bezüglich der Hybride in dem ersten Messpunkt annähernd im Gleichgewicht ist, das heißt bei dem das System einen Zustand erreicht, der annähernd demjenigen der Reaktionsgleichung I in Figur 1 entspricht.
- 25
- 30

Da die Temperatur, bei der ein Mikroarrayexperiment durchgeführt wird, abhängig ist von den auf dem jeweiligen Mikroarray angeordneten Sonden und der daraus resul-

tierenden optimalen Hybridisierungstemperatur für ein solches Mikroarray, ist es von besonderem Vorteil, wenn man ein erfindungsgemäßes Mikroarray verwenden kann, das mehrere Sätze von Messpunkten aufweist, die jeweils zumindest einen ersten

Messpunkt mit zu Zielmolekülen komplementären Sondenmolekülen (PM) und einen

5 zweiten Messpunkt mit zu den Zielmolekülen unvollständig komplementären Son- denmolekülen (MM) aufweisen, wobei die Hybride der Zielmoleküle mit den komple- mentären Sondenpunkten (PM) der unterschiedlichen Sätze jeweils eine andere

Schmelztemperatur aufweisen, und wobei für jeden Satz separate Sonden- und

10 Zielmoleküle vorgesehen sind, die so ausgewählt sind, dass Fehlhybridisierungen

oder Kreuzhybridisierungen zwischen Zielmolekülen eines Satzes und Sondenmole- külen eines anderen Satzes nahezu ausgeschlossen sind.

Wenn der Unterschied der Schmelztemperaturen von Hybriden der Zielmoleküle mit dazu komplementären Sonden unterschiedlicher Sätze zumindest ein Grad Celsius

15 beträgt, und mit Hilfe dieser Sätze ein Bereich zwischen 20°C und 60°C abgedeckt wird, so kann der Anwender ein derartiges Mikroarray verwenden, um Systeme zum Durchführen von Hybridisierungsexperimenten zu kalibrieren, die bei einer beliebigen Betriebstemperatur zwischen 20°C und 50°C ablaufen.

20 Beispielsweise kann der Hersteller einer Hybridisierzvorrichtung, in der die Hybridisie- rungsreaktion vollautomatisch ablaufen soll, für jede denkbare Betriebstemperatur zwischen 20°C und 60°C Parameter wie die Agitationsart der Hybridisierungskam- mer, die aufgetragene Schichtdicke des Probenmaterials, die Reaktionsdauer usw.

mit Hilfe des Mikroarrays optimieren und in einem Gerätespeicher speichern, der mit

25 einer Steuerung verbunden ist, die die Vorrichtung unter Berücksichtigung der im Speicher enthaltenen Daten steuert. Der Endnutzer muss dann nur die von ihm ge- wünschte Hybridisierungstemperatur eingeben, und die Vorrichtung kann mit Hilfe der Steuerung die für die jeweils gewählte Hybridisierungstemperatur günstigsten Parameter automatisch einstellen.

30

Mit Hilfe erfindungsgemäßer Mikroarrays lassen sich Hybridisierungsvorrichtungen auch nachkalibrieren, beispielsweise durch den Hersteller, oder aber durch den An- wender selbst prüfen oder nachkalibrieren.

Validiert wird ein System, indem man das Mikroarray etwa bei der Schmelztemperatur der Hybride mit Zielmolekülen in Verbindung bringt und die Hybridisierung nach einem vorbestimmten Protokoll (siehe Fig. 8) ausführt und anschließend feststellt, ob der Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten Messpunkte mit Hybriden  
5 und der zweiten bzw. dritten Messpunkte mit Fehlhybriden einem vorbestimmten Wert entspricht oder diesen übertrifft. Dieser Wert ist für jeden Gerätetyp vom Hersteller des Gerätes festzulegen. Wenn ein System diese Bedingung erfüllt, so ist es korrekt validiert. Ansonsten entspricht das Gerät nicht den Anforderungen. Anhand der ermittelten Werte lassen sich verschiedene Systeme, also Vorrichtungen  
10 und/oder Verfahren zum Hybridisieren untereinander vergleichen.

Die Validierung lässt sich mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Mikroarrays mit unterschiedlichen Sätzen von Sondenmolekülen bei verschiedenen für jede Schmelztemperatur, für die ein Satz auf dem Mikroarray vorgesehen ist, separat durchführen.  
15

Kalibrierung und Validierung lassen sich an unterschiedlichen Stellen eines Mikroarrays gleichzeitig wiederholen. So kann man die ersten, zweiten und gegebenenfalls dritten Messpunkte eines Satzes von Sondenmolekülen auf einem Mikroarray an unterschiedlichen Stellen wiederholt auftragen. So kann ein Mikroarray vollständig  
20 von Messpunkten eines oder mehrerer Sätze bedeckt sein, die sich in regelmässigen Abständen wiederholen.

Führt mit einem solchen Chip Hybridisierungsexperimente mit entsprechenden Zielsequenzen durch, lässt sich ermitteln ob physikalische und/oder chemische Parameter lokale Unterschiede auf dem Mikroarray verursachen, und falls ja, bei welchen  
25 Parametern derartige Unterschiede auf ein Minimum reduziert sind.

Beispielsweise lassen sich Inhomogenitäten mittels eines derartigen Mikroarrays leicht nachweisen: an den Stellen, an denen die Temperierung des Mikroarrays  $T_m$   
30 am nächsten kommt, weisen die erfassten Signalintensitäten der jeweiligen Messpunkte eines Satzes die höchsten Werte auf, und an anderen Stellen niedrigere Werte. Durch Variation der Parameter lassen sich diejenigen Parameter ermitteln, bei denen die Unterschiede zwischen den so ermittelten Werten ansonsten identischer Sätze auf ein Minimum reduziert sind.

Im folgenden wird die Erfindung im Rahmen eines Ausführungsbeispiels näher erläutert. In diesem Ausführungsbeispiel werden Oligonukleotide als Sondenmoleküle und Zielmoleküle verwendet. Dies ist jedoch keineswegs beschränkend zu verstehen.

5 Die Erfindung ist gleichermaßen durchführbar mit anderen Arten von Sonden und Zielmolekülen, wie beispielsweise DNA, RNA, mRNA, cDNA, PNA, tRNA, mRNA, LNA, aRNA, PNA, Proteinen, Antigenen/Antikörper, Peptide, Steroidhormone oder andere biologisch relevante Analyten.

10 Ausführungsbeispiel 1

Auf einem epoxybeschichteten Glasobjektträger (75x25 mm Schott nexterion slide E) werden in regelmäßigen Abständen Messpunkte aufgetragen, in denen Oligonukleotide mit einer Gesamtlänge von 26 bzw. 30 Nukleotiden und mit einem Aminolink am

15 5' Ende vorgesehen sind. Die Oligonukleotidsequenzen enthalten jeweils einen Spacer von insgesamt 10 Tymidinen. Die für die Hybridisierung jeweils relevante Sequenz ist ein 16 bzw. 20mer. Die hybridisierungsrelevante Sequenz ist dabei aus 4 bzw. 5 Blöcken zu je vier Nukleotiden aufgebaut. Zwei der vier Blöcke legen den GC-Gehalt des Oligonukleotides und damit im wesentlichen dessen Schmelztemperatur  
20  $T_m$  fest, die restlichen Blöcke haben einen GC-Gehalt von 50%. Eine schematische Darstellung derartiger Sonden sind in Figuren 2A, 2B wieder gegeben. Fig. 2A zeigt den schematischen Aufbau einer als GC 67 bezeichneten Sonde, deren Schmelztemperatur bei 67°C liegt. Die Fig. 2B zeigt den schematischen Aufbau zweier weiterer Sonden GC 58 und GC 48, die jeweils eine Schmelztemperatur von 58°C bzw.  
25 48°C aufweisen. Zu jeder dieser drei Sonden existieren auf dem Mikroarray Sonden, die sich um ein Nukleotid (mismatch 1, MM1) bzw. um zwei Nukleotide (mismatch2, MM2) von den Sonden unterscheiden. In Figuren 2A, 2B ist der jeweilige Vierer-Nukleotidblock, in dem ein solches Nukleotid ausgetauscht wurde, schematisch mit den Bezeichnungen MM1, MM2 dargestellt. Die exakten Sequenzen der auf dem  
30 Chip vorgesehenen Sonden sowie deren Bezeichnung ergibt sich aus der Tabelle in Fig. 3. Der Nukleotidaustausch erfolgt in dem Vierer-Nukleotidblock, der den GC-Gehalt der jeweiligen Mikroarraysonde festlegt. Durch den Nukleotidaustausch wird der GC-Gehalt des Mikroarraysondenmoleküls nicht geändert, der GC-Gehalt der mismatch-Sondenmoleküle entspricht dem GC-Gehalt der zugehörigen perfectmatch-

Sondenmoleküle. Zusätzlich enthält das gespottete Chipset eine Negativkontrolle (GC 37).

Zu den Sondenmolekülen werden Zielmoleküle synthetisiert, die perfekt komplementär zu den Sondenmolekülen GC 67, GC 58 und GC 48 sind und die am 5'-Ende

5 jeweils Cy3 markiert sind. Es handelt sich um 16 bzw. 20mere (Fig. 4a, Fig. 4b). Die Zielnukleinsäuren haben die in der Tabelle der Fig. 5 wiedergegebenen Eigenschaften.

10 Auf dem oben genannten Glasslide der Firma Schott werden die jeweiligen Sondenmoleküle in einer Konzentration von 40 µmol bei einem Spotdurchmesser von etwa 120 µm aufgespottet. Es werden vier identische Mikroarrays hergestellt, die Messpunkte in acht Spalten und drei Reihen aufweisen. In den ersten beiden Spalten eines jeden Mikroarrays sind dabei Negativkontrollsonden (GC 37) aufgespottet, in den 15 Spalten 3 und 4 sind jeweils perfectmatch-Sondenmoleküle PM aufgespottet, in den Spalten 5 und 6 jeweils mismatch-Sondenmoleküle MM1, bei denen ein Nukleotid ausgetauscht wurde aufgespottet, und in den Spalten 7 und 8 mismatch-Sondenmoleküle MM2, bei denen zwei Nukleotide ausgetauscht wurden aufgespottet. In der ersten Reihe sind die jeweiligen Sondenmoleküle PM, MM1 und MM2 mit der 20 Schmelztemperatur 67°C aufgespottet, in der zweiten Reihe diejenigen mit der Schmelztemperatur 58°C, in der Spalte 3 diejenigen mit der Schmelztemperatur 48°C. Dieses Mikroarray weist somit Messpunkte auf, die einen Temperaturbereich zwischen 48°C und 67°C und somit von 19°C abdecken. In Fig. 6 sieht man vier derartige Mikroarrays untereinander angeordnet.

25

Ein erstes Mikroarray wird mit einem Reaktionsgemisch versetzt, das alle drei der 5'-Cy3 markierten Oligonukleotide GC 67, GC 58 und GC 48 in einer Konzentration von jeweils einem Nanomol pro Liter enthält, bei einer Hybridisierungstemperatur von

30 67°C mit Hilfe eines Arrayboosters der Firma Advalytix GmbH, Brunnthal, bei einer Durchmischungseinstellung am Arraybooster von 26 dbm durchgeführt. Die aus diesem Experiment resultierenden Signalintensitäten entsprechen den Signalintensitäten der in der Fig. 6 an erster Stelle dargestellten Mikroarrayoberfläche. In einem zweiten Mikroarray-Hybridisierungsexperiment bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C wird unter ansonsten gleichen Bedingungen ein Ergebnis erhalten, wie es

schematisch in Fig. 6 dem an zweiter Stelle von oben gezeigten Mikroarray entspricht. An dritter Stelle schematisch dargestellt ist das Ergebnis eines entsprechenden Experimentes bei 48°C, und an vierter Stelle eines entsprechenden Experimentes bei 38°C. Die Tabellen der Fig. 7A bis 7D geben die jeweils gemessenen Signalintensitäten in den in der Fig. 6 dargestellten Mikroarrays bei den Experimenten, die bei 67°C (Fig. 7A), 58°C (Fig. 7B), 48°C (Fig. 7C), 38°C (Fig. 7D) durchgeführt wurden.

In der Fig. 6 oben erkennt man das Ergebnis des ersten Hybridisierungsexperiments bei 67°C. Aus der Fig. 7A sind die entsprechenden Intensitätswerte (Detektion von Cy3) aufgelistet. Bei einer Schmelztemperatur von 67°C trägt der Mittelwert der Signalintensität in den Messpunkten, die die Sonde GC 67 aufweisen, 28.507,25 Einheiten. Die Signalintensität in dem Messpunkt, der die Sonde GC 67 MM1 aufweist, beträgt lediglich 1/100 davon, die Signalintensität in den Messpunkten, die die Sondenmoleküle GC 67 MM2 enthalten, ist noch geringer, sie beträgt weniger als ein 1/300 des in dem Messpunkt mit den Sonden GC 67 ermittelten Mittelwertes. Führt man dasselbe Experiment bei einer Temperatur von 58°C durch, so liegen die in diesen Messpunkten ermittelten Signalintensitäten weniger weit auseinander. Bei 58°C beträgt die Signalintensität in dem Messpunkt GC 67 MM2 etwa ein 1/160 der in dem Messpunkt GC 67 ermittelten Signalintensität, und der in dem Messpunkt GC 67 MM1 ermittelte Wert beträgt etwa 1/7 des in dem Sondenpunkt GC 67 ermittelten Wertes. Bei 48°C und bei 38°C schließlich schrumpft der Faktor auf Werte zwischen 1,28 und 1,88. Bei 58°C ist der aus den Signalintensitäten der perfectmatch-Sonden und den Signalintensitäten der jeweiligen mismatch-Sonden gebildete Faktor für die GC 58-Sonden am größten, wohingegen er bei den anderen Temperaturen für diese Sonden abnimmt. Die gleiche Aussage lässt sich für die GC 48-Sonden machen, bei denen der ermittelte Signalintensitätsunterschied bei einem Hybridisierungsexperiment, das bei 48°C durchgeführt wurde, am größten ist. Deutlich erkennbar ist dies in Fig. 6, wenn man die jeweiligen Reihen der Sonden auf den jeweiligen Mikroarrays miteinander vergleicht. Der Signalintensitätsunterschied der GC 67-Sonden ist bei dem bei 67°C durchgeführten Hybridisierungsexperiment am größten, wie sich an dem ganz oben in der Fig. 6 dargestellten Mikroarray im Vergleich zu den übrigen drei Mikroarrays erkennen lässt. Weniger deutlich, aber doch erkennbar, ergibt sich dasselbe Bild für die Sonde GC 58, bei denen der Signalintensitätsunterschied bei

dem 58°C-Hybridisierungsexperiment erkennbar am stärksten ist. Dasselbe gilt für die GC 48-Sonden, die die größten Unterschiede bei den Signalintensitäten auf dem dritten Chip von oben aufweisen, der aus einem Hybridisierungsexperiment resultiert, das bei 48°C durchgeführt wurde.

5

Im Kontrollexperiment schließlich sind Unterschiede im Hybridisierungsverhalten zwischen den Sonden GC 67, GC 67 MM1, GC 67 MM2 einerseits und den Sonden GC 58, GC 58 MM1, GC 58 MM2 andererseits kaum auszumachen. Dies unterstreicht auf plakative Weise, dass ein Mikroarrayexperiment, das bei physikalischen Parametern durchgeführt wird, die nicht zur Einstellung eines Gleichgewichtes führen, das einem Gleichgewicht bei  $T_m$  entspricht, kaum Aussagekraft hat.

Die Fig. 6 gibt damit das Ergebnis eines erfindungsgemäßen Kalibrierungsverfahrens wieder, bei dem die Temperatur des Systems während der Hybridisierung (Hybridisierungstemperatur) variiert wurde. Hat man beispielsweise bei einer Vorrichtung, die ein Peltierelement aufweist, die elektronische Steuerung dieses Peltierelementes so kalibriert, dass es für Mikroarrays, deren Sonden eine Schmelztemperatur von 67°C aufweist, optimale Ergebnisse liefert, so kann man anschließend das Kalibrierungs-

-15 experiment wiederholen und dabei einen anderen Parameter als die Temperatur variieren, beispielsweise die Durchmischungseinstellung am verwendeten Arraybooster im vorliegenden Experiment oder aber den auf das System wirkenden Druck, die Schichtdicke des aufgetragenen Reaktionsgemisches, die Art und Weise der Auftragung des Reaktionsgemisches, die Targetkonzentration, die Pufferkonzentration und die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, sowie beliebige weitere Parameter,

-20

25 die das Hybridisierungsexperiment und die Einstellung eines Hybridisierungsgleichgewichtes beeinflussen können.

#### Ausführungsbeispiel 2

30 Die Sequenzen eines zweiten Ausführungsbeispiels der auf dem Chip vorgesehenen Sonden sowie der entsprechenden Zielmoleküle sind in Fig. 9 gezeigt. Das Mikroarray des zweiten Ausführungsbeispiels ist grundsätzlich genauso ausgebildet wie das Mikroarray des ersten Ausführungsbeispiels, und unterscheidet sich vom ersten Ausführungsbeispiel nur durch die anderen Sondensequenzen. Dieses Ausführungs-

beispiel umfasst vier PM-Testpunkte für die Schmelztemperaturen 61°C, 53°C, 43°C und 33°C sowie korrespondierende MM1-Testpunkte und MM2-Testpunkte. Weiterhin ist ein Sondenpunkt für eine Negativ-Kontrolle vorgesehen. Dieses Mikroarray weist somit Messpunkte auf, die einen Temperaturbereich zwischen 33°C und 61°C 5 und somit von 28°C abdecken. Der maximale Temperaturunterschied zwischen zwei PM-Testpunkten mit benachbarten Schmelztemperaturen beträgt hier 10°C. Dieser Temperaturunterschied sollte zumindest nicht größer als 15°C sein. Es kann auch zweckmäßig sein den maximalen Temperaturunterschied zwischen zwei PM-Testpunkten mit benachbarten Schmelztemperaturen auf weniger als 10°C, insbesondere auf 8°C bzw. 5°C zu beschränken.

10 In den Ausführungsbeispielen werden Cy-3 als Fluoreszenzmarker verwendet, um die relative Menge von in Messpunkten gebildeten Hybriden ermitteln zu können. Es können aber auch andere Markierungssysteme verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind, etwa andere Fluoreszenzfarbstoffe, oder auf anderen Detektionsmechanismen als der Fluoreszenz beruhende Markierungen.

15 Ebenso können erfindungsgemäße Mikroarrays anstelle von Nukleinsäurematerial auch Proteinmaterialien oder andere Materialien als Sondenmoleküle aufweisen, je nachdem, was für eine Art von Mikroarray mit dem zu validierenden oder zu kalibrierenden System untersucht werden soll.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann folgendermaßen zusammengefasst werden:

- a) Verwenden eines Mikroarrays mit
  - zumindest einem ersten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  aufweisen.
  - zumindest einem zweiten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  aufweisen,
- b) Verwenden von Zielmolekülen die zu Sondenmolekülen (PM) in einem oder mehreren ersten Messpunkten des Mikroarrays komplementär sind, und
- c) Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Ziel-

molekülen bei Variierung eines bestimmten Parameters,

d) Feststellen der Signalintensitäten in Abhängigkeit der Veränderung des Parameters, wobei der Parameterwert bei dem maximalen Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte der Parameterwert ist, bei dem

5 das System bezüglich der Hybride in dem ersten Messpunkt annähernd im Gleichgewicht ist, und auf den das System kalibriert wird.

Patentansprüche

5    1. Verfahren zum Kalibrieren eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten mit folgenden Schritten:

      a) Bereitstellen eines Mikroarrays mit

         - zumindest einem ersten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  aufweisen.

      b) Bereitstellen von Zielmolekülen die zu Sondenmolekülen (PM) in einem oder mehreren ersten Messpunkten des Mikroarrays komplementär sind, und

      c) Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Zielmolekülen bei Variierung eines bestimmten Parameters,

      d) Feststellen der Signalintensitäten in Abhängigkeit der Veränderung des Parameters, wobei der Parameterwert bei dem maximalen Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte der Parameterwert ist, bei dem das System bezüglich der Hybride in dem ersten Messpunkt annähernd im Gleichgewicht ist, und auf den das System kalibriert wird.

25    2. Verfahren zum Validieren eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten mit folgenden Schritten:

      a) Bereitstellen eines Mikroarrays mit

         - zumindest einem ersten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  aufweisen.

         - zumindest einem zweiten Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  aufweisen,

b) Bereitstellen von Zielmolekülen, die zu den Sondenmolekülen (PM) in einem oder mehreren ersten Messpunkten des Mikroarrays komplementär sind, und  
c) Durchführen eines Hybridisierungsexperimentes mit dem Mikroarray und den Zielmolekülen bei Standardparametern bei Verwendung des zu validierenden Systems,  
5 d) Feststellen der Signalintensitäten, wobei die Validierung erfolgreich ist, wenn der Unterschied zwischen den Signalintensitäten der ersten und zweiten Messpunkte einem vorbestimmten Validierungswert entspricht.

10 3. Mikroarray zum Validieren und/oder Kalibrieren eines Systems zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten, aufweisend:  
- einen PM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (PM), die komplementär zu Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Hybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  aufweisen.  
15 - einen MM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM1), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind und die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM1)$  aufweisen, wobei  
das Mikroarray mehrere PM-Messpunkte mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen und dazu korrespondierende MM-Messpunkte aufweist, und die unterschiedlichen Schmelztemperaturen mindestens einen Bereich von 15°C abdecken.  
20  
4. Mikroarray nach Anspruch 3,  
25 **dadurch gekennzeichnet,**  
dass zu einem PM-Messpunkt zumindest ein zweiter MM-Messpunkt mit darin befindlichen Sondenmolekülen (MM2), die unvollständig komplementär zu den Zielmolekülen sind, die mit den Zielmolekülen Fehlhybride ausbilden können, die sich von den Sondenmolekülen des anderen zum PM-Messpunkt korrespondierenden MM-Messpunktes unterscheiden und die eine Schmelztemperatur  $T_m(MM2)$  aufweisen.  
30  
5. Mikroarray nach Anspruch 3 oder 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**

-25-

dass die Sondenmoleküle ausgebildet sind aus: DNA, RNA, mRNA, cDNA, PNA, tRNA, mRNA, LNA, aRNA, PNA, Proteinen, Antigenen/Antikörper, Peptide, Steroidhormone oder andere biologisch relevante Analyten

5    6. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Sondenmoleküle aus ex-situ hergestellten Oligonukleotiden ausgebildet sind.

10    7. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Sondenmoleküle aus in-situ hergestellten Oligonukleotiden ausgebildet sind.

15    8. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_m(\text{PM})$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_m(\text{MM1})$  und/oder  $T_m(\text{MM2})$  von Fehlhybriden zumindest  $0,5^\circ\text{C}$  beträgt.  
20  
9. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_m(\text{PM})$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_m(\text{MM1})$  und/oder  $T_m(\text{MM2})$  von  
25    Fehlhybriden zwischen  $0,1^\circ\text{C}$  und  $5^\circ\text{C}$  beträgt.

30  
10. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass jeder Messpunkt auf dem Array mehrfach vorkommt.  
11. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass der PM-Messpunkt in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem bzw. einem der

korrespondierenden MM-Messpunkte ist.

12. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**

5 dass die Hybride der Zielmolekülen mit den komplementären PM-Messpunkten jeweils eine andere Schmelztemperatur aufweisen, die sich ausreichend so voneinander unterscheiden, dass Fehl- oder Kreuzhybridisierungen zwischen unterschiedlichen PM-Messpunkten nahezu ausgeschlossen sind.

10 13. Mikroarray nach Anspruch 12,  
**dadurch gekennzeichnet,**

dass der Unterschied der Schmelztemperaturen von Hybriden der Zielmoleküle mit dazu komplementären PM-Messpunkten zumindest 1°C bis 10°C beträgt.

- 15 14. Mikroarray nach Anspruch 12 oder 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**

dass die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der unterschiedlichen PM-Messpunkte einen Bereich von mindestens 20°C, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C bzw. 60°C abdecken.

20 15. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**

dass zu einem jeden PM-Messpunkt ein korrespondierender MM-Messpunkt mit exakt einer Fehlstelle in den Sonden bzgl. der Zielmoleküle vorgesehen ist.

25 16. Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**

dass zu einem jeden PM-Messpunkt ein korrespondierender MM-Messpunkt mit exakt zwei Fehlstellen in den Sonden bzgl. der Zielmoleküle vorgesehen ist.

30 17. Kit zum Validieren und/oder Kalibrieren von Systemen zum Durchführen von Mikroarray-Experimenten, umfassend:  
- ein Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 – 16, und

- zumindest Zielmoleküle, die zu den Sondenmolekülen (PM) auf dem Mikroarray komplementär sind.

18. Kit nach Anspruch 17,

5 **dadurch gekennzeichnet,**

dass die Sondenmoleküle (PM, MM) und die Zielmoleküle ausgebildet sind aus:  
DNA, RNA, mRNA, cDNA, PNA, tRNA, mRNA, LNA, aRNA, PNA, Proteinen,  
Antigenen/Antikörper, Peptide, Steroidhormone oder andere biologisch relevante Analyten

10

19. Kit nach Anspruch 17 oder 18,

15 **dadurch gekennzeichnet,**

dass der Temperaturunterschied  $\Delta T$  zwischen der Schmelztemperatur  $T_m(PM)$  von Hybriden und der Schmelztemperatur  $T_m(MM)$  von Fehlhybriden zumindest  
0,5 K beträgt.

20. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass ein Mikroarray nach einem der Ansprüche 3 bis 16 verwendet wird.

20

21. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

**dadurch gekennzeichnet,**

dass ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 19 verwendet wird.

25